Studien an Eisenorganismen

I. Mitteilung

Über die Art der Eisenspeicherung bei Trachelomonas und Eisenbakterien

Von

Josef Gicklhorn

Aus dem Pflanzenphysiologischen Institute der Universität zu Graz

(Mit 5 Textfiguren)

(Vorgelegt in der Sitzung am 22. April 1920)

I.

A) Den Ausgangspunkt der im folgenden mitgeteilten Studien bilden Beobachtungen an verschiedenen Trachelomonasarten nach Durchführung der bekannten Eisenreaktion mit gelbem Blutlaugensalz und Salzsäure. Für diese Untersuchungen standen mir drei Trachelomonasarten zur Verfügung; da bei der bekannten Variabilität dieses Eisenflagellaten eine Bestimmung nur annähernd möglich war, unterlasse ich die Artdiagnosen und verweise statt aller Beschreibung auf Fig. 1.

Sämtliche Formen sind bei gleicher Vergrößerung unter Berücksichtigung der für eine Bestimmung notwendigen Merkmale gezeichnet, die während einer einmonatlichen Beobachtung als konstant sich erwiesen.

Die Trachelomonaden sind als typische »Eisenorganismen« — im Sinne von Gaidukov[1] und Molisch[2] — bekannt;

---

[1] Gaidukov N.: Über die Eisenalge *Conferva* und die Eisenorganismen des Süßwassers im allgemeinen. Ber. d. Deutsch. bot. Ges. 1905, p. 250 bis 252.

[2] Molisch H.: Die Eisenbakterien. 1910 Jena, Verl. Fischer. p. 56.

im mikroskopischen Bild zeigt der oft verschiedenartig skulpturierte, verhärtete Panzer eine leicht gelbe bis tief braune Färbung, die durch eingelagertes Fe_2O_3 bedingt ist.

Prüft man nun auf den Eisengehalt durch Anwendung der von Molisch[1] und anderen als sicherste und beste Reaktion erkannten Berlinerblauprobe, so erhält man in diesem speziellen Fall nicht nur verschieden intensive Blaufärbung des Gehäuses, sondern auch verschiedene Lokalisation des gebildeten Berlinerblau; entscheidend ist, wie später begründet wird, die Art der Durchführung der Reaktion und der Zustand des Flagellaten. Die beistehende Fig. 2 kann die Verhältnisse am einfachsten darstellen.

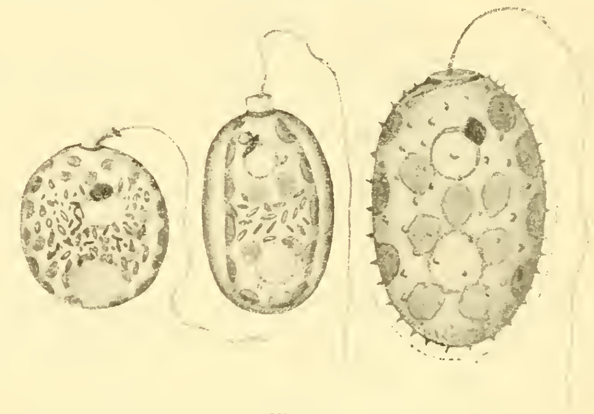


Fig. 1.

Die für die Reaktionen verwendeten Trachelomonas-Arten nach dem lebenden Objekt gezeichnet. Vergr. zirka 1000mal.

I. Kann der Panzer gleichmäßig eine tiefe Blaufärbung annehmen, ohne weitere Veränderungen zu zeigen. Das gilt vor allem für leere Gehäuse, aber auch für die Anfangsstadien der Reaktion bei solchen, in welchen der lebende Flagellat sich noch befindet (Fig. 2*a*).

II. Kann die sonst auf das Gehäuse scharf lokalisierte Reaktion auch außerhalb des Gehäuses auftreten und dieses mit einem blau gefärbten Hof umgeben. Der Berlinerblau-

[1] Molisch H.: Mikrochemie der Pflanze. 1913. Jena, Verl. Fischer, p. 39 bis 40.

niederschlag ist entweder körnelig oder homogen blau, ohne Struktur (Fig. 2*b*).

III. Kann die anfänglich auf das Gehäuse beschränkte Reaktion durch Bildung typischer Traube'scher Zellen als Blasen und Beutel ein ganz absonderliches Bild bieten; sackartig umgibt die Niederschlagsmembran das Gehäuse, dabei in 2 bis 5 Minuten auf das Doppelte der Gehäusegröße heranwachsend (Fig. 2*c*).

Der Ort und die Art der Bildung kann unter dem Mikroskop leicht verfolgt werden; unter gewissen Bedingungen entstehen aber die sackartigen Niederschlagsmembranen

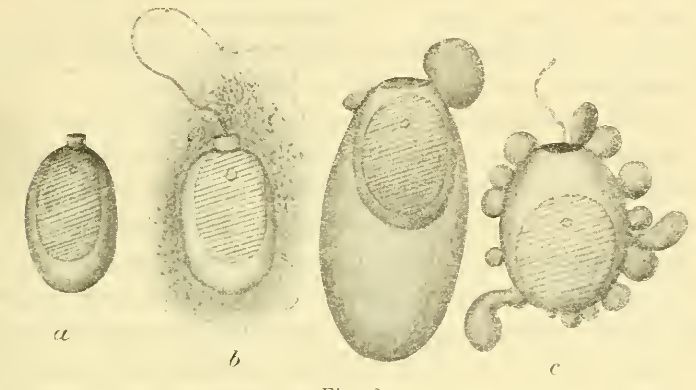


Fig. 2.

Die drei Typen der Berlinerblaureaktion bei Trachelomonaden: *a)* gleichmäßig tiefblaue Färbung des Gehäuses, nachdem zuerst K_4FeCN_6 zugefügt wurde, später HCl; *b)* schwache Färbung des Gehäuses, dieses von tiefblauem, homogenem und körneligem Niederschlag von Berlinerblau umgeben; Reaktionsbedingungen wie bei *a)*, doch mit besonderer Vorsicht ausgeführt, um stärkere Strömungen im Präparat zu vermeiden; *c)* Bildung Traube'scher Zellen um das Gehäuse und auf diesem; Reagentien gleichzeitig zugefügt. — Flagellat einfach schraffiert mit eingezeichnetem Augenfleck. Vergr. zirka 700mal.

ruckartig und ein förmliches Herausschnellen eines blauen Beutels aus der mit einem versteiften Kragen umgebenen Geißelöffnung hat in erster Linie die Aufmerksamkeit auf sich gelenkt.

B) Als Bedingungen für diese auch durch Übergänge verbundenen Typen der Reaktion wurden erkannt: die Art der Durchführung der Eisenreaktion einerseits, das Fehlen

oder Vorhandensein des lebenden Flagellaten anderseits. Nach den Erfahrungen von Molisch[1] wird die Probe auf Eisenverbindungen (Fe_2O_3 locker gebunden) folgendermaßen angestellt:

»Zarte Objekte, Algenfäden, dünne Schnitte legt man auf einen Objektträger in einen Tropfen gelber Blutlaugensalzlösung und fügt einen Tropfen verdünnter Salzsäure hinzu...... Ich verwende in der Regel eine 2% Blutlaugensalzlösung und eine höchstens 5% Salzsäure. Die zu untersuchenden Objekte müssen zunächst vom Kaliumferrocyanid ganz durchtränkt werden...... Dann läßt man die Salzsäure entweder direkt auf den Objektträger oder bei dickeren Objekten wieder in Glasdosen einwirken.«

Auf diese Weise erhält man eine sichere Reaktion durch Berlinerblaubildung; aber bei Verwendung von frischem, lebendem Versuchsmaterial in unserem Fall fast ausnahmslos Reaktionen vom Typus II, wie Fig. 2*b* zeigt.

Wenn man aber die beiden Reagentien am Objektträger gut mischt, und dann direkt in den Tropfen das Material aus der Pipette zufließen läßt und nach raschem Auflegen des Deckglases beobachtet oder — was besser geeignet ist — die Probe mit dem Versuchsmaterial neben den Reagenstropfen bringt und sodann beim Auflegen des Deckglases auf die Diffusionszone achtet, so tritt die Berlinerblaubildung fast ausnahmslos nach Typus III der Reaktion auf (Fig. 2*c*). Wird ferner die Probe auf dem Objektträger mit einem der Reagentien — gleichgültig mit welchem zuerst — versetzt, nach einiger Zeit das Entsprechende, z. B. die Salzsäure mit Filterpapier nachgesaugt, so stellt sich vorwiegend eine Berlinerblaubildung nach Typus I ein (Fig. 2*a*). Nach der Kenntnis dieser Verhältnisse gelang es mir jederzeit mit Sicherheit, irgendeinen der erwähnten Reaktionstypen zu erzielen und demonstrieren zu können.

C) Die Erklärung für dieses verschiedene Verhalten ist am einfachsten in folgender Überlegung zu geben. Fügt man z. B. zuerst Salzsäure zu, so erfolgt rasche Tötung des lebenden Flagellaten; durch die eindringende Salzsäure wird das gebundene Eisen aus dem Gehäuse und dem Flagellaten

---

[1] Molisch: Mikrochemie etc., p. 39 bis 40.

— darüber später — gelöst, in reaktionsfähige Form gebracht und kann mit dem $K_4Fe(CN)_6$ als Berlinerblau nachgewiesen werden. Das Gleiche gilt für den Fall, als man zuerst gelbes Blutlaugensalz einwirken läßt; auch hier werden durch die Tötung des Objektes Bedingungen geschaffen, die ein Freiwerden des Eisens in reaktionsfähiger Form ermöglichen, zumindest vorbereiten, was durch nachfolgenden Salzsäurezusatz in erhöhtem Maße eintritt. In beiden Fällen aber, durch den zeitlich getrennten Zusatz von $K_4Fe(CN)_6$ und HCl bedingt, wird eine Diffusion des nachzuweisenden Eisens eintreten (Typus II).

Wird beim Durchsaugen des Präparates, — auch bei bloßem Zusatz vom Rande des Deckglases her treten Strömungen auf — das diffundierte Eisen weggespült, so kann nur das noch übrige, noch nicht gelöste Eisen nach erfolgtem Freiwerden in Reaktion treten. Daher muß ein lokalisierter Eisennachweis, in der Regel auf das Gehäuse beschränkt, nach Typus I sich einstellen.

Wenn man aber beide Reagentien gleichzeitig wirken läßt, so muß in dem Augenblick als das Eisen in reaktionsfähiger Form in genügender Menge frei wird — man denke an die enorme Empfindlichkeit der Probe — auch schon die Bildung von Berlinerblau stattfinden. Bei ungestörter Reaktion wird die einsetzende Diffusion des Eisens sofort durch die Niederschlagsmembran von Berlinerblau aufgehalten werden, was schließlich zur Bildung von Traube'scher Zellen führen muß, für deren Entstehung und Wachstum in diesem Falle also die gleichen Bedingungen gelten, wie für die Ferrocyankupfermembran des bekannten Vorlesungsversuches oder bei der Pfeffer'schen Zelle. Diese Erklärung gilt auch für jene Fälle, wo durch Gallerte oder Schleime, z. B. bei Algen, Bakterien, Flagellaten usw. überhaupt Eisen in reichlicher Menge gespeichert wird oder eingelagert werden kann. Die verschiedenen Typen der Eisenreaktion hat auch Klebs[1] bei

[1] Klebs G.: Über die Organisation der Gallerte bei einigen Algen und Flagellaten. Untersuchungen aus d. bot. Instit. zu Tübingen, II. Bd., 1886 bis 1888, p. 333 bis 418, besonders p. 366

Zygnema beobachtet und seine Erklärung deckt sich vollkommen mit der hier gegebenen, wie ich nach Abschluß der mikroskopischen Beobachtungen beim Literaturstudium finden konnte.

D) Woher stammt das freigewordene Eisen? Auf den ersten Blick scheint das Gehäuse das meiste Eisen zu enthalten; es wäre aber auch möglich, daß der lebende Flagellat selbst Eisenverbindungen führt, oder daß zwischen Gehäuse und dem Flagellaten eisenreiche Stoffe gelöst oder in Schleim absorbiert sich finden könnten. Der hohe Eisengehalt des Gehäuses ist jedenfalls tatsächlich vorhanden, wenn auch mit dieser Feststellung noch gar nichts über das Zustandekommen der Eisenspeicherung ausgesagt werden kann. Die Berücksichtigung der eben erwähnten Möglichkeiten hat nun das sichere Resultat ergeben, daß die Hauptmenge des nachgewiesenen Eisens bei Trachelomonas aus dem Innern des Gehäuses stammt. Dieser Befund erklärt am einfachsten die verschiedenen Bilder der Eisenreaktion, wenn diese um das Gehäuse zonenförmig auftritt, was aber bei leeren Gehäusen nicht oder nie in dem Maße als an bewohnten zu beobachten ist. Nun habe ich nie bei den vielen Hunderten von Objekten den chlorophyll führenden Flagellaten selbst bei Zusatz von $K_4Fe(CN)_6$ und HCl durch gebildetes Berlinerblau gefärbt gesehen. Ich war daher geneigt, die Hauptmenge des Eisens als locker gebundene oder in Schleim absorbierte Verbindungen zwischen dem starren Gehäuse und dem amöboid, beziehungsweise kontraktil beweglichen Flagellaten zu suchen. Diese Annahme ist hinfällig geworden durch Beobachtungen, aus denen mit Sicherheit hervorgeht, daß die nachgewiesenen Eisenoxydverbindungen aus dem **Plasma** des lebenden Flagellaten stammen, beziehungsweise unter bestimmten Bedingungen ausgeschieden werden.

Führt man die Eisenreaktion bei Trachelomonas derart aus, daß die gemischten Reagentien vom vorgeschriebenen Prozentgehalt durch Auflegen des Deckglases mit dem Versuchstropfen vereinigt werden und beobachtet man die beweglichen Trachelomonaden, wenn diese in das abgestufte

Konzentrationsgefälle der Reagentien kommen, so ergeben sich ganz einheitlich folgende Bilder: (Fig. 3*a*, *b*, *c*.) Die rasche Bewegung wird langsamer, es erfolgt ein Taumeln und Drehen am Ort und in dem Maße als der Flagellat sich kontrahiert, erscheint an der Geißelöffnung langsamer oder auch ruckartig vorgestoßen ein tiefblau gefärbter Beutel von Berlinerblau; oder in anderen Fällen kommt es zur Bildung eines körneligen Niederschlages von Berlinerblau, der wie ein Springbrunnen aus der Geißelöffnung hervorquillt. Immer aber erfolgt noch durch kurze Zeit, etwa 10 Sekunden bis $1/2$ Minute lang, eine geringe Bewegung des Flagellaten, der

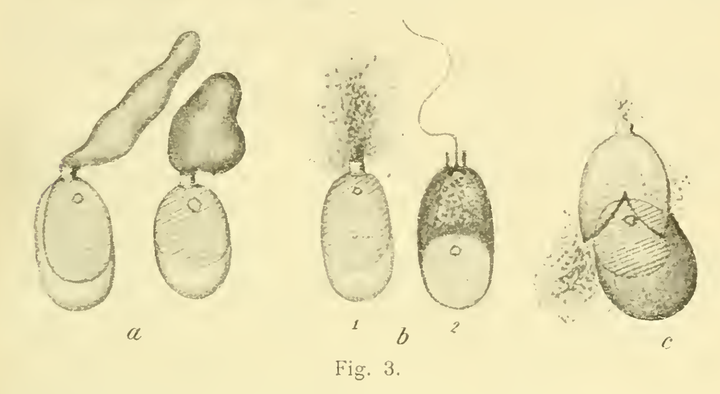


Fig. 3.

Niederschlagsformen an lebenden Flagellaten bei gleichzeitigem Zusatz von $K_4Fe(CN)_6$ + HCl. *a)* Beutelbildung ruckartig von dem Geißelkragen aus entstehend; *b)* körneliger Niederschlag fontänenartig hervorgestoßen (1), beziehungsweise im Gehäuseinnern gebildet, wenn durch die Geißel mit anhaftendem Plasmapfropf die Öffnung verstopft ist (2); *c)* bei zerdrücktem Gehäuse um den kontrahierten, freigelegten Flagellaten ist eine langsam wachsende Niederschlagsmembran entstanden. Vergr. zirka 700 mal.

dann sich abrundet und getötet im Gehäuse als grüner Ballen mit rotem Fleck (Augenfleck!) liegen bleibt. Wird vorerst durch einen stärkeren Druck auf das Deckglas das Gehäuse gesprengt und so der Flagellat ganz oder teilweise freigelegt, so erfolgt die Eisenreaktion sofort in stärkster Intensität um den Flagellaten zu einer Zeit, wo das Gehäuse noch gar keine oder eine leicht grünlichblaue Färbung zeigt. Ist der Druck nicht so kräftig gewesen, um den Flagellaten zu schädigen, so erfolgt nach

der Bewegung einmal die Eisenreaktion dort, wo der Flagellat das Gehäuse ganz oder teilweise verlassen hat, dann aber in etwas schwächerer Intensität bei der Einwirkung des $K_4Fe(CN)_6 + HCl$. Bei allen diesen Reaktionen bleibt aber stets der Flagellat ohne merkbare Blaufärbung durch Berlinerblau.

Aus diesen Beobachtungen folgt in einwandfreier Weise die Tatsache, daß die Hauptmenge des nachzuweisenden Eisens aus dem lebenden Protoplasten stammt und daß Eisengehalt des Organismus und Einspeicherung in der gebildeten Hülle ganz getrennt auftreten können. Trotz des hohen Eisengehaltes, geschätzt an der tiefblauen Färbung der ausgeschiedenen Verbindung, können die Gehäuse, namentlich bei jüngeren Individuen gar kein Eisen oder nur sehr geringe Mengen davon führen. Das nachgewiesene Eisen wird vom lebenden Flagellaten unter gewissen Bedingungen eben aktiv ausgeschieden und findet sich in Oxydform vielleicht in den äußeren Plasmaschichten vor. Ob bei der nachgewiesenen Eisenreaktion nachher Bildung Traube'scher Zellen erfolgt oder körnelige Niederschläge von Berlinerblau auftreten, hängt von der Geschwindigkeit der Tötung ab; bei fast augenblicklicher Wirkung genügend hoher Konzentration der Reagentien ist das Entstehen von blauen Blasen und Beuteln die Regel.

Es ist aber noch eine Möglichkeit zu berücksichtigen: Vielleicht könnten die nachgewiesenen Eisenverbindungen doch aus dem umgebenden Wasser des Versuchstropfens stammen, und durch etwa ausgeschiedenen Schleim des Flagellaten eine Adsorption erfolgt sein, oder das Gehäuse beträchtliche Eisenmengen bei der Reaktion in reaktionsfähiger Form abgeben, das dann fälschlich als aus dem Protoplasten stammend hier angegeben wird?

Dieser Einwand wird hinfällig durch folgende Beobachtungen und Überlegungen:

1. Zeigt das Wasser des Versuchstropfens auch nach längerer Zeit in der Umgebung der Flagellaten keine nachweisbaren Mengen gelöster Eisenverbindungen.

2. müßte man eine ganz plötzliche Eisenspeicherung bis zur vollen Sättigung annehmen, um die tiefblaue Färbung zu erklären: eine Annahme, die gewiß allen Erfahrungen über Adsorption widersprechen würde.

3. Ist deutlich — wie schon früher erwähnt — zu sehen, daß die Diffusion der nachweisbaren Eisenverbindungen vom Flagellaten aus um das Gehäuse hofförmig ausgebreitet erfolgt, nicht aber bei leeren Gehäusen, zu mindest nicht in diesem Maße.

4. Zeigt die Möglichkeit, die Eisenverbindungen nach der Tötung des Versuchsobjektes fortwaschen zu können, daß nicht die Eisenverbindungen des umgebenden Wassers die Reaktion bedingen.

5. Zeigt die Geißel nach der Tötung des Flagellaten nur soweit die »Beizewirkung« der Eisensalze, als die Diffusionszone reicht; dann hebt sich bei der Berlinerblaubildung die Geißel wie mit Gentianaviolett tingiert ab, wobei die peitschenförmige Gestalt klar hervortritt (Fig. 2*b*).

6. Würden selbst bei Berücksichtigung der enormen Empfindlichkeit der Eisenreaktion die Spuren in der geringen Wassermenge eines Versuchstropfens nicht hinreichen, um die intensiven Reaktionen bei den angegebenen Versuchen verständlich machen zu können.

Auf Grund der erwähnten Überlegungen und der früher mitgeteilten Beobachtungen geben sonach die oben angeführten Folgerungen die einfachste und naheliegendste Erklärung.

E) Die Ausscheidung von Eisenverbindungen, in Form eisenhaltiger Gallerte und Schleime.

Auf Grund von Beobachtungen kann schließlich nur die Annahme in Betracht kommen, daß wir darin einen typischen Reizvorgang zu erblicken haben. Es stehen auch hier eigene Beobachtungen an Trachelomonas vollständig im Einklang mit den Studien von Klebs[1] an Euglenaarten-Trache-

[1] Klebs l. c. p. 405 bis 410 und Klebs G., Unters. aus d. bot. Inst. zu Tübingen, Bd. I, 1881 bis 1885, besonders p. 274 bis 277.

lomonas ist ja auch eine Euglenacee —, so daß ich diese Angaben etwas eingehender erwähnen muß.

Zunächst hebt Klebs hervor, daß »die Gallerte bei Flagellaten stets ein Ausscheidungsprodukt und nicht ein Umwandlungsprodukt der peripherischen Haut ist« (p. 404). Weiters zeigt namentlich *Euglena sanguinea* bei Zusatz verdünnter Methylenblaulösung »in dem Moment der Berührung des Farbstoffes .... ein lebhaftes Hin- und Herzucken, Zusammenziehen und Wiederausdehnen .... von dem Körper strahlen nach allen Seiten sofort tiefblau sich färbende Gallertfäden, welche sich zu einer Hülle in Form eines Netzwerkes vereinigen. Die Gestalt dieser Gallertausscheidung ist in den einzelnen Fällen außerordentlich verschieden, hängt von der Individualität der Euglena, von der Natur, von der Konzentration des Farbstoffes ab....« (p. 405). Oft »erscheint die Gallerte fast wie ein homogener, diluierter Schleim« (p. 405), besonders bei Verwendung von verd. Methylgrün.

Ferner ergab sich die Tatsache, daß »das Cytoplasma die Substanz durch die Plasmamembran preßt, welche gegenüber der vegetabilischen Zellhaut sich durch ein sehr viel dichteres Gefüge auszeichnen muß und sich in dieser Beziehung wie die Hautschicht des vegetabilischen Plasmas verhält.... « (p. 406). Klebs vermutet sogar, daß bei *Euglena sanguinea* ein Zusammenhang der Gallertausscheidung besteht mit den »Gallertstäbchen, welche sehr regelmäßig in Spiralreihen auf der Plasmamembran sitzen, entsprechend ihrer Spiralstreifung, so daß wahrscheinlich an den schmalen Furchen zwischen den eigentlichen Spirallinien die Ausscheidung erfolgt«.... Weiters ».... läßt sich feststellen, daß an der noch lebenden Euglena innerhalb der Plasmamembran im peripherischen Protoplasma sich kugelige Körper.... färben, welche vielleicht das Bildungsmaterial für die Ausscheidung darstellen« (p. 406). Weitere Prüfung ergab: »Die größere Mehrzahl der Euglenaceen hat nicht die Fähigkeit, auf äußere Reize hin sofort Gallerte auszuscheiden; die Bildung derselben bei Teilungen, Ruhezuständen geht langsam vor sich, so daß sie nicht direkt sichtbar wird« (p. 406 bis 407), aber es »spricht alles dafür, daß die Hülle in gleicher Weise gebildet wird« (p. 276 im I. Bd. der Tübinger Unters.).

Die genaue Prüfung der Tatsachen führt zu der begründeten Annahme, daß »die Gallertausscheidung in die Reihe der Reizerscheinungen gehört, da nur lebende Individuen der Euglena dieselben zeigen. Die Rolle des auslösenden Reizes können sehr verschiedene Momente spielen, außer Farbstofflösungen auch Salzlösungen, schwache Alkalien, Säuren, mechanischer Druck usw. Diese Mittel müssen eine gewisse schädigende Einwirkung ausüben; denn solche Farbstoffe, wie z. B. Kongoroth, Indigkarmin, Nigrosin.... vermögen nicht die Gallertausscheidung herbeizuführen. Diese reizauslösenden Farbstoffe müssen hierfür auch eine gewisse Konzentration besitzen.... Eine Lösung des Methylenblaus von 1 : 100.000 wirkt noch deutlich...., eine solche von 1 : 200.000 nicht mehr.... Meistens tritt der Erfolg sehr schnell ein.... selbst schnell

tötende Mittel, wie Jodlösung, Alkohol bewirken noch eine Ausscheidung. Dagegen tötet 1% Osmiumsäure so momentan, daß keine Gallerte mehr gebildet werden kann« (p. 405 bis 406).

Die Analogie eigener Beobachtungen mit allen wesentlichen Angaben von Klebs ist so auffallend, daß ich eben diese Studien statt ausführlicher Wiedergabe der eigenen hersetze. Das Verhalten der von mir beobachteten Trachelomonas-Arten ist das gleiche wie es Klebs bei Verwendung von Farbstoffen gesehen hat und seinen Folgerungen ist nur vollinhaltlich beizustimmen. Auch liegt es nahe, mit Klebs »der Gallerte selbst eine gewisse Veränderungsfähigkeit zuzuschreiben, insofern sie gleich nach der Ausscheidung in Berührung mit dem Außenmedium in begrenztem Maße Wasser aufnehmen und infolge dieser Quellung zu homogenen Hüllen verschmelzen kann« (p. 407).

Ich möchte hier, als Einschaltung gedacht, erwähnen, daß die in der Mikrobiologie so viel verwendete und empfohlene »Tuschemethode« auch als »reizauslösendes Mittel« gelten muß, wie eigene Erfahrungen nach Kenntnis der Verhältnisse lehren und daß das Tuscheverfahren mit größter Vorsicht an lebenden (!) Infusorien, Flagellaten, Bakterien usw. anzuwenden ist. Ausführliche Mitteilungen nach Abschluß dieser Beobachtungen werden anderenorts gegeben werden.

F) Über die Eisenspeicherung im Gehäuse. Klebs[1] und ebenso Molisch[2] lassen zwei Möglichkeiten offen: entweder besitzt die anfangs eisenfreie, zarte Gallerthülle »eine ganz besonders ausgebildete Anziehungskraft.... infolge deren sie aus der höchst verdünnten Eisensalzlösung (in Form des kohlensauren Salzes), wie sie das Wasser unserer Sümpfe darstellt, das Eisenoxydhydrat herausziehen kann« (Klebs p. 407). Oder man kann auch an die Möglichkeit denken, »daß bei diesen Arten der lebendige Organismus bei der Eisenspeicherung wirksam ist.....« (p. 407). Auf Grund der früher beschriebenen Ergebnisse der vorliegenden Arbeit kann nur die zweite Möglichkeit in Betracht kommen, da nur durch Beteiligung des lebenden Protoplasten jene intensive Eiseneinlagerung im Gehäuse erklärt werden kann. Der lebende Protoplast führt, wie nachgewiesen wurde,

---

[1] l. c., p. 407, [2] l. c. Eisenbakterien, p. 54 bis 55.

beträchtliche Mengen einer Eisenoxydverbindung, die nur aus dem umgebenden Wasser stammen kann, und es ist wohl das Naheliegendste und Einfachste, anzunehmen, daß vom Plasma aus gleichzeitig mit Ausscheidung der Hüllen Eisen abgegeben werden kann, beziehungsweise in diese allmählich eingelagert wird. Mit dieser Eisenablagerung ist allem Anschein nach eine physikalisch-chemische Zustandsänderung der Hülle verbunden, deren Adsorptionsvermögen für Eisen sich eben im Laufe der Zeit ändern muß. Es ist hier nur ein Spezialfall der bekannten Zustandsänderungen überhaupt der Adsorptionsfähigkeit im besonderen, wie sie allgemein Gallerten und viele Kolloide nach Einwirkung von Salzlösungen zeigen. Auf diese Frage will ich bei Besprechung der Befunde an Leptothrix zurückkommen, vorerst noch die eine weitere Frage berücksichtigen, nämlich:

G) Über die Bindung des Eisens im Plasma und im Gehäuse.

Im Gehäuse finden sich Eisenoxyde, aber auch Oxydulverbindungen; der Nachweis mit rotem Blutlaugensalz und Salzsäure in den von Molisch angegebenen Konzentrationen gelingt jederzeit. Allerdings muß man einige Zeit länger warten als bei der Berlinerblauprobe. Das Plasma führt aber nur sehr geringe Mengen von Eisenoxydulverbindungen und der ausgestoßene Schleim zeigt sehr selten oder nur in nebensächlich geringen Mengen durch Bildung von Turnbullsblau die Gegenwart von Eisenoxydulverbindungen an. Das Plasma des toten Flagellaten führt weder FeO noch Fe_2O_3-verbindungen in nachweisbarer Menge; beim Absterben, nicht aber bei bloßer Reizung, wird alles Eisen ausgestoßen.

Auf die weitere Frage, in welcher Verbindung das Eisen auftritt, vermag ich keine Antwort zu geben; auch bisher hat man immer von »Eisenverbindungen« gesprochen; nur Winogradsky[1] nimmt an, »daß nach der Oxydation zunächst ein neutrales Eisenoxydsalz irgend einer organi-

[1] Winogradsky S., Über Eisenbakterien. Bot. Zeitung, 1888, 46. Jhrg., p. 260 bis 270, speziell 268.

schen Säure...« sich bildet. Mit gelbem und rotem Blutlaugensalz allein tritt keine Reaktion ein, obwohl zahlreiche organische Eisenverbindungen, wie Molisch[1] bei der Überprüfung der Angaben von Zaleski gefunden hat, sicher reagieren. Der versuchte Nachweis von Karbonaten war ebenfalls negativ. Möglicherweise ist durch eine mikrochemische Untersuchung des ausgeschiedenen Schleimes ein Anhaltspunkt zu gewinnen, obwohl die bisherigen Daten über die Mikrochemie der Schleime sehr dürftig sind.

Auch in der Frage, inwieferne der Eisengehalt und die Eisenspeicherung bei Trachelomonas mit der Assimilation zusammenhängt, kann keine abschließende Antwort gegeben werden. Unter Hinweis auf die Versuche von Pringsheim und Hassack hält Molisch[2] es für sehr wahrscheinlich, daß die Eisenalgen die erforderliche CO_2 auch den gelösten Bikarbonaten des Eisens entziehen können, durch den bei der Assimilation freiwerdenden O das Eisen oxydieren und in der Hülle deponieren: eine Annahme, die Hanstein[3] zur Erklärung der Eisenspeicherung bei Eisenalgen zuerst geäußert hat. Die Prüfung mit Phenolphtaleïn auf Alkalien, wie sie bei der Assimilation auftreten[4], fiel sowohl makroskopisch als auch im mikroskopischen Bild negativ aus. Doch sind dies Fragen, die nur durch ausgedehnte physiologische Versuche einwandfrei beantwortet werden können. Für die Hauptfragen der Physiologie der Eisenspeicherung scheinen mir die zwei letzten Fragen aber nebensächlich zu sein, besonders dann, wenn man die Verhältnisse bei den Eisenbakterien, die ja in erster Linie für eine Theorie der »Eisenorganismen« in Betracht kommen, berücksichtigt; hier fallen die Fragen über die Rolle des Chlorophylls, beziehungsweise der CO_2-Assimilation im Lichte bei der Aufnahme und Ablagerung der Eisenverbindungen überhaupt weg.

---

[1] Molisch H., Die Pflanze in ihren Beziehungen zum Eisen. 1892. Jena. Verl. Fischer, pag. 51.

[2] Siehe Eisenbakterien 2, p. 54.

[3] Molisch: l. c. p. 53.

[4] Siehe Klebs: l. c. p. 341.

Schließlich möchte ich noch erwähnen, daß für alle mitgeteilten Beobachtungen stets viele Hunderte von Trachelomonas-Individuen geprüft wurden, daß aber für die meisten Versuche die größeren Formen gewählt wurden und erst ergänzend auch die übrigen herangezogen wurden.

H) Ohne auf Details einzugehen, will ich noch erwähnen, daß verschiedene Bilder der Berlinerblaureaktion am Gehäuse von Trachelomonas auf einen schaligen Bau des Panzers hinweisen. Durch die rasch anwachsenden Niederschlagsmembranen kommt es oft zu einer direkten Häutung des Panzers, indem die äußerste, skulpturierte Schichte dem Berlinerblau gewissermaßen den Rückhalt bietet, wobei trotz Dehnung des rasch wachsenden Beutels alle Feinheiten der Skulptur erhalten bleiben (siehe Fig. 4*a*).

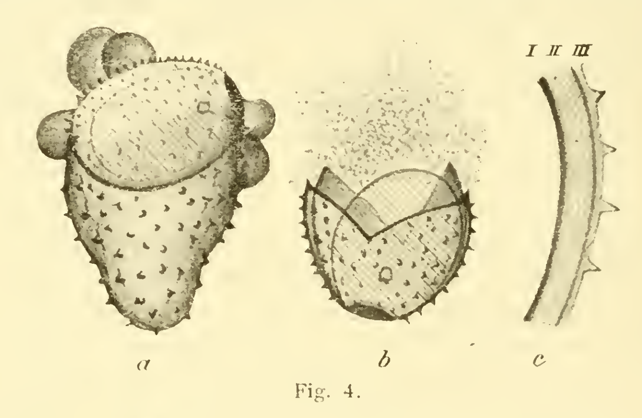


Fig. 4.

Beutelbildung und Verteilung der Eisenreaktion am Trachelomonas-Gehäuse. *a)* Die wachsende Niederschlagsmembran von Berlinerblau hat die äußerste skulpturierte Hülle auf einer Schalenhälfte abgehoben und gedehnt; der so freigelegte innere Schalenanteil ist vollständig glatt und hat schwächere Blaufärbung; *b)* am zerdrückten Gehäuse ist die innerste Schichte abgelöst und durch deutliche Fe-Reaktion sichtbar zu machen; *c)* Schema des Schalenbaues. I. innerste Schichte, II. Zwischenschichte, III. äußerster skulpturierter Schalenanteil. Vergr. zirka 1000 mal.

Desgleichen ist nach Aufsprengen des Gehäuses eine innerste, feine Lamelle ebenfalls häufig durch die wachsenden Niederschlagsmembranen abzuheben (Fig. 4*b*), so daß zwischen diesen beiden Schichten eine starke Schale, die den Hauptanteil des Panzers ausmacht, zu liegen kommt. Obwohl weder bei noch so starken Vergrößerungen, noch nach verschiedenen Färbungen eine der erwähnten Schichten gesondert zu sehen ist, muß man deren differente Ausbildung doch als wirklich vorhanden annehmen, da die Häutung so leicht und unter so regelmäßigen Bildern erfolgt, daß eine andere Deutung

dagegen nur gezwungen erscheinen kann. Der Bau der Membran wäre danach so wie Fig. 4*c* zeigt. Ich glaube, daß man darin ein weiteres Beispiel der Leistungsfähigkeit der Mikrochemie, der Berlinerblauprobe im besonderen, sehen kann, indem hier, ähnlich wie bei Molisch's Nachweis[1] des Procambiumnetzes in Kotyledonen von Sinapis eine morphologische Differenzierung am einfachsten und sichersten durch eine mikrochemische Reaktion aufzuzeigen ist. Die Niederschlagsmembranen von Berlinerblau bilden nach längerem Liegen an ihrer Oberfläche eine feine, zierliche netzige Struktur aus, die aber jedesmal entsteht, auch dort, wo vorher keine Struktur des rasch wachsenden Beutels zu finden ist.

II.

1) Die mitgeteilten Beobachtungen gewinnen nun ein größeres Interesse, wenn man die Übertragung auf typische Eisenbakterien versucht und findet, daß im wesentlichen gleiche Verhältnisse vorliegen. Es ist auffallend, wie weit die Ähnlichkeit geht und ich glaube, daß von hier aus eine klare Beurteilung der bisher gegebenen Theorien der Eisenspeicherung von Winogradsky und Molisch möglich ist. Obwohl gerade in Fragen der Bakteriologie, auch in vielen anderen Gebieten der Physiologie, die Gültigkeit einer allgemeinen Theorie erst am einzelnen Objekt zu prüfen ist, sind in unserem Falle so ziemlich alle bisher bekannten einschlägigen Beobachtungen einheitlich zu gruppieren, zum mindesten ohne weitere, erst wieder zu begründende Hilfsannahmen verständlich zu machen. Für die Untersuchung der Eisenbakterien habe ich in erster Linie Leptothrix ochracea gewählt, deren Physiologie und Morphologie durch die grundlegenden monographischen Arbeiten von Molisch[2] genau bekannt ist. Ich hatte üppige Rohkulturen in hohen Standgläsern, wie man sie nach Winogradsky[3] sich verschaffen kann; teilweise kam Material — fast speziesrein in außerordentlich großen Lagern — mit dünner Scheide zur Verwendung; auch im Freien gesammelte Eisenbakterien und Leptothrix von verschiedenen Proben meiner Kultur-

[1] Siehe Mikrochemie p. 40.

[2] l. c. Eisenbakterien.

[3] Siehe Anmerkung p. 198 dieser Arbeit p. 236; in meinen Versuchen nur Grazer Leitungswasser ohne besonderen Eisenzusatz!

gläser mit Algen und Infusorien wurde benützt. Die Stärke der Scheiden war in diesen verschiedenen Proben recht wechselnd, ebenso der Grad der Eiseneinlagerung, so daß ich alle Übergänge in gewünschter Vollständigkeit vor mir hatte. Geht man nun vergleichend die Ergebnisse durch, wie sie auf Grund von Untersuchungen an Trachelomonas mitgeteilt wurden, so zeigt sich folgendes:

1. liefert die Berlinerblauprobe entweder eine streng auf die Scheide mit den eingeschlossenen Bakterien lokalisierte Reaktion (Typus I); oder um die Bakterien, beziehungsweise die Scheiden erfolgt körnelig oder homogen blau Berlinerblaubildung (Typ. II); diese besondere Form der Fe-Reaktion ist bisher weder bei Bakterien noch an anderen Objekten berücksichtigt worden, vielleicht sogar als mißlungene Reaktion angesehen worden. Oder aus den Scheiden, sei es an der Oberfläche oder der Bruchstelle einer kräftigen Scheide, treten kleine Blasen und Säckchen hervor (Typ. III). Fäden mit dünner Scheide sind besonders geeignet für die Reaktion vom Typus III (!) und II, solche mit starker, gallertig verquollener Scheide für die Berlinerblaubildung nach Typus III. Fig. 5 veranschaulicht dies am verständlichsten. Die Bedingungen sind die gleichen, unter welchen auch Trachelomonas bei der Reaktion mit $K_4Fe(CN)_6 + HCl$ so wechselnde Bilder gezeigt hat, ebenso gelingt je nach der Art der Durchführung der Probe auch hier eine willkürliche Darstellung eines der erwähnten Typen; die früher gegebene Erklärung ist auch hier zutreffend.

2. Das nachgewiesene Eisen stammt hier zum größten Teil aus der braun gefärbten Scheide, doch es ist nicht ausschließlich auf diese beschränkt, sondern in mehr minder großer Menge auch in **der lebenden Bakterienzelle** zu finden. Auch dort, wo bei festsitzenden Fäden ein deutlicher Gegensatz von Basis und Spitze der Bakterienfäden ausgeprägt ist, wo die Scheide um die letzten 4—20 Zellen überhaupt noch nicht oder nur in sehr geringer Dicke gebildet ist, tritt eine tiefe Blaufärbung der Bakterienzelle auf, wenn die Scheide kaum einen leichtblauen Farbenton durch Berlinerblau erkennen läßt. Daher

kann auch bei Leptothrix Eisengehalt der Zelle und Eisenspeicherung in der Scheide getrennt sein. Selbst bis tief in die Scheide, — von der Spitze weg gerechnet — die bereits kräftig Eisenoxydverbindungen eingelagert zeigt, ist der annähernd gleich intensive Farbenton der Bakterienzelle zu verfolgen, wenn auf Fe_2O_3-Verbindungen geprüft wird. Diese Tatsache scheint zur Beurteilung der bisherigen Erklärungsversuche der Eisenaufnahme

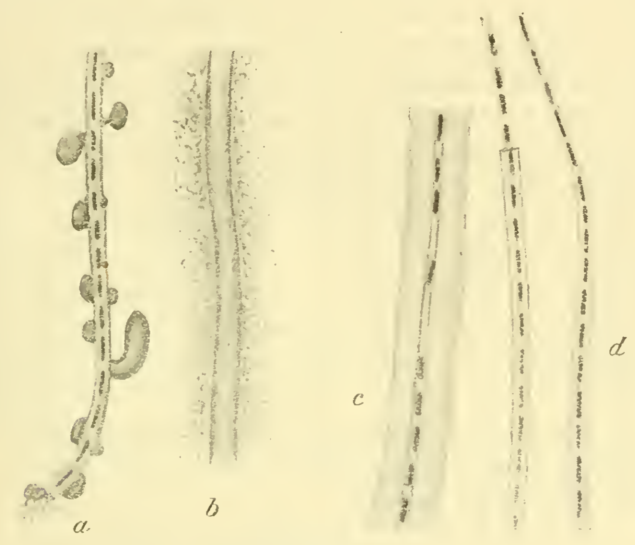


Fig. 5.

Eisenreaktion an *Leptothrix ochraceae. a)* Die Schleimhülle zeigt Beutelbildung, die Bakterien selbst tiefblau gefärbt; *b)* Reaktion an alten Scheiden mit Berlinerblaubildung außerhalb der Scheide; *c)* Leptothrixfäden mit kräftiger Scheide in der Wasserhaut wachsend; *d)* Leptothrixfäden von tieferen Wasserschichten mit bedeutend schwächerer Scheide; die Bakterienzellen selbst weisen bei *c)* und *d)* starke Fe-Reaktion auf, auch dort wo noch keine oder nur eine sehr zarte Scheide gebildet ist, die keine Fe-Reaktion erkennen läßt. Vergr. zirka 1000mal.

und -speicherung von Bedeutung zu sein. Molisch[1] kam bei seinen Versuchen zu Ergebnissen, die er in folgenden Sätzen ausdrückt: ».... wenn das Plasma der Eisenbakterie wirklich mit so großer Begierde Eisenoxydul aufnähme, dann

---

[1] Siehe: Die Pflanze in ihren Beziehungen zum Eisen, p. 69.

sollte man doch dieses hier auch nachweisen können. Eisen ist aber im Plasma nie nachweisbar, in der Scheide aber immer.[1] Selbst nach ganz kurzem Aufenthalt in verdünnter Ferrocarbonat- oder in einer anderen Eisenlösung wird man mit Leichtigkeit mittels der Blutlaugensalzprobe Eisen in der Gallertscheide, nicht aber in den Zellen konstatieren können.«[2] Und weiters wird nach Molisch »ohne vorher erst in das Innere der Zellen oder, genauer gesagt, in das Plasma einzutreten« das Eisensalz eben in erster Linie in der Gallerthülle zurückgehalten, die »wie ein Filter fungiert« (ebenda p. 70). Dem gegenüber betont später aber Molisch in seiner Monographie der Eisenbakterien selbst ausdrücklich, ...»daß die Leptothrixfäden sehr gierig Eisenoxydulverbindungen aufnehmen....« daß »....für eine merkbare Reaktion schon einige Minuten genügen....« und daß dann ....»das Eisen in dem Faden sowohl in der Oxyd- als in der Oxydulform vorhanden ist. Es färben sich die Scheiden und die Zellen.«[3] Das Ergebnis seiner so umfassenden und exakten Versuche faßt Molisch[4] in den letzten Untersuchungen dahin zusammen: »Daher bin ich der Meinung, daß das Eisenoxydul in die Fäden und zwar in die Scheiden, zum Teil auch in die Zellen vordringt (!)....[5]«

Nun beziehen sich aber diese Reaktionen in erster Linie auf Fälle, wo die Eisenbakterien in Lösungen übertragen (!) wurden, die eine ungleich höhere Konzentration der Eisensalze aufweisen, als es bei gewöhnlicher Kultur in Leitungswasser der Fall ist (z. B. durch Oxydation reduziertes Fe in destilliertem H_2O oder nach Durchleitung und Sättigung (!) mit CO_2, ebenso »verdünnte Ferrocarbonat- oder eine andere Eisenlösung« ($^0/_0$?). Die hier erwähnten Beobachtungen an Leptothrix, die im Leitungswasser ohne Zusatz von $Fe_2(OH)_3$ gezogen wurde und trotzdem auch in den Zellen Eisenverbindungen in reichlicher Menge führt, besonders dort,

[1], [2] und [3] von mir gesperrt.

[4] Molisch: Eisenbakterien, p. 49.

[5] Von mir hervorgehoben.

wo eine Scheide noch gar nicht merkbar ausgebildet ist, zeigt, daß der Eisengehalt der lebenden Bakterienzelle doch nicht ganz nebensächlich sein kann. Ob das Eisen in der Zelle nachzuweisen ist, hängt eben auch von der Art der Ausführung der Reaktion ab und aus den Zellen könnte das Eisen recht leicht und schnell diffundiert sein, wenn man nicht das $K_4Fe(CN)_6$ und die Salzsäure gleichzeitig wirken läßt. Das dürfte in vielen Untersuchungen nicht gebührend betont worden sein, da man auf die hier Typus II genannte Reaktionsform beim Fe-Nachweis bisher nicht Rücksicht genommen hat. Vielleicht ist das der Grund, warum Molisch kein Eisen in der Zelle nachweisen konnte und auch in späteren Arbeiten die Reaktion der Eisenverbindungen der Zelle gegenüber der intensiven Färbung der Scheide zurücktreten läßt. Bei meinen Versuchen an gewaschenen Leptothrixfäden oder mit Präparaten nach Molisch's Deckglasmethode hergestellt, sind gerade die Reaktionen der jüngeren Fäden sehr kräftig gewesen und haben die Eisenbakterien wie mit Methylenblau gefärbt von den eisenfreien, anderen Fadenbakterien abgehoben.

3. Auch bei Leptothrix ist die Eisenreaktion in der Zelle und den Scheiden sehr kräftig, wenn im umgebenden Wasser der Probe kein Fe in nachweisbaren Mengen auftritt; ebenso kann aus toten Zellen das Eisen diffundieren und im Versuchstropfen nachgewiesen werden; ferner ist die neuerliche Eisenspeicherung von eisenfrei gemachten Zellen und Scheiden bei Leptothrix nie so kräftig, als es das lebende Material zeigt; weiters stammt auch hier das Fe der Zelle nicht etwa aus der Scheide, sondern ist in der Zelle schon vorhanden, denn auch die jüngsten Bakterien ohne Scheiden zeigen tiefe Blaufärbung.

Aus alledem folgt, daß der lebende Protoplast eine größere Rolle spielt, als man nach den bisherigen Befunden erwarten sollte.

4. Die Scheidebildung der Eisenbakterien ist ebenso wie bei den Flagellaten durch Ausscheidung seitens des Protoplasten und nicht durch Umwandlung der

Membran zu erklären. Gerade bei den Eisenbakterien liegen die Verhältnisse der Gallertbildung durch »reizauslösende« Stoffe und Bedingungen recht klar. So sagt Molisch[1]: »Fehlt das Eisen in der Lösung, so wächst und vermehrt sich die Leptothrix zwar sehr gut, allein die Fäden bleiben relativ kurz und die Scheiden bleiben dünn. Bei Darbietung von gelöstem Eisen verdicken sich die Scheiden und Eisen wird darin als Eisenoxyd deponiert« und ferner ». . . . jeder kann sich leicht überzeugen, daß gerade die Dicke[2] gallertartiger Eisenbakterienscheiden nach der Zusammensetzung des Mediums außerordentlich schwankt. . . . «.[3] Daß auch mechanische Einflüsse maßgebend sein können, zeigt die Ausbildung von Haftscheiben bei Cladothrix dichotoma, Chlamydothrix sideropous und den übrigen festsitzenden Eisenbakterien, ebenso die Gallerthöfe von Liderocapsa Treubii und S. major. Auch die kräftige Scheidenbildung an Leptothrix, die knapp unter der Wasseroberfläche wächst oder in der Wasserhaut selbst sitzt, ist vielleicht durch die Wirkung des atmosphärischen Sauerstoffes mit bedingt. Die Stärke der Gallertscheide hängt mit von der Wirkung auf den lebenden Protoplasten ab; ist nicht einfach eine bis zu einem gewissen Grad fortschreitende Quellung bereits gebildeter Gallerte, die durch immer kräftigere Eisenspeicherung eine Verdickung erfährt. Zum Teil betont dies auch Molisch[4].

Ich möchte erwähnen, daß auch durch siedendes Wasser abgetötete Leptothrixfäden, wie man sich mittels der Blutlaugensalzprobe überzeugen kann, Eisenverbindungen gierig anziehen und speichern, doch schreitet die Speicherung nicht bis zu jener auffallenden Verdickung der Scheiden vor, wie man sie an den lebenden Fäden bemerkt. Hier fehlt dann der Einfluß der lebenden Zelle.[5]

Die Wirkung des umgebenden Mediums auf die Dicke der Gallertscheide ist nur durch den Einfluß des Protoplasten zu erklären.

---

[1] l. c. p. 50.

[2] Von mir gesperrt.

[3] Ebenda p. 47.

[4] Ebenda p. 49.

[5] Von mir gesperrt

5. Die erhöhte Gallertausscheidung bei Zufuhr von größeren Eisenmengen ist, ähnlich wie in den Versuchen von Klebs, dadurch leicht verständlich, daß die Eisensalze in größerer Konzentration schneller und ausgiebiger als »reizauslösende« Wirkung den Protoplasten beeinflussen können, ebenso wie der stete Kontakt der basalen Zellen festsitzender Eisenbakterien in gleicher Weise wirksam sein kann. Der Erfolg tritt nur nicht so schnell ein wie bei Trachelomonas, ist aber prinzipiell von der ruckartigen Abgabe gallertartiger, eisenhaltiger Stoffe durch den Protoplasten bei Reizung mannigfacher Art nicht verschieden. Nur darin kann der »Einfluß des Plasmas auf die Gallerte und ihre merkwürdige Anziehungskraft für Eisenverbindungen«, von welchem die verschiedenen Autoren sprechen, sich geltend machen.

6. Ist es ähnlich wie bei Trachelomonas auch für Leptothrix wohl auf Grund dieser Befunde das Einfachste, nicht ausschließlich eine Filterwirkung anzunehmen, sondern an eine dauernde, langsam vor sich gehende Eisenabgabe vom Protoplasten her zu denken. Damit ist unter geänderten Bedingungen, z. B. beim Abtöten der Zellen und Änderung des Zustandes der Gallerte nach Kochen oder Einwirkung von HCl, ebenso bei älteren Scheiden, ferner beim Übertragen in stärker konzentrierte Eisenlösungen als das Leitungswasser ist, eine Eisenspeicherung der Gallerte allein zugegeben. Die Zustandsänderung der Gallerte unter gewöhnlichen Bedingungen — Leitungswasser oder solches aus Tümpeln, Teichen etc. — nach Art der »Beizewirkung« von Eisensalzen ist ebenso verständlich, wenn man an eine Eisenabgabe vom Plasma her denkt, als wenn eine Filterwirkung angenommen wird, die bei jungen Zellen, die sonst wohl Eisen führen, gar nicht anzuwenden ist, da eine als Filter funktionierende Scheide ja noch nicht oder nur in minimalem Grade ausgebildet ist. Es wird einstimmig von Eisenbakterien angegeben — und ich selbst konnte mich überzeugen — daß eine Eisenspeicherung der Gallerte allein nie jenen Grad der Gelb- bis Braunfärbung erreichen kann, als es unter dem dauernden Einfluß lebender Zellen geschieht. Es stellt sich eben bald ein Gleichgewichtszustand

ein, sobald der einer bestimmten Gallertmenge bestimmter Konstitution entsprechende Sättigungsgrad der Adsorption für Fe-Verbindungen erreicht ist. Eine chemische Umsetzung mit der Substanz der Gallerte anzunehmen, wobei eben fortwährend für neu eintretendes Eisen Platz geschafft würde, ist schon deshalb abzuweisen, weil ja die Speicherungsversuche mit leeren Scheiden ergeben, daß nur ein ganz bestimmter Grad der Eisenaufnahme nachzuweisen ist — alles das Gesagte für die Dauer des Versuches gemeint.

7. Es liegen auch bei Leptothrix in erster Linie Fe_2O_3-Verbindungen vor. Wie diese aus dem FeO durch Oxydation entstanden sind, kann hier übergangen werden. Jedenfalls hat für Leptothrix die Aufnahme und Oxydation zu Fe_2O_3 nicht jene Bedeutung, als Winogradsky meinte und es ist ja das wesentlichste und bestbegründete Ergebnis der ausgedehnten Versuche von Molisch, daß das Eisen für die »Eisenorganismen« nur zum Aufbau des Protoplasten erforderlich und nicht Energiequelle des Betriebsstoffwechsels ist. Da sowohl FeO als Fe_2O_3-Verbindungen, wenn auch in ungleichem Grade löslich sind, kann der Protoplast beide aufnehmen und es ist gewiß richtig, wenn Molisch[1] sagt: »Bei der Aufnahme organischer Eisenverbindungen mag das lebende Plasma auch für die Abspaltung des Eisens sorgen und auf diese Weise in den Prozeß der Eisenablagerung eingreifen«.

8. Auch für die Eisenbakterien ist bisher unentschieden, was es denn für »Eisenverbindungen« sind, welche in der Scheide und der Zelle nachgewiesen werden. Auch hier tritt mit gelbem oder rotem Blutlaugensalz allein keine Reaktion auf.

9. Das Überwiegen von Fe_2O_3-Verbindungen ist nicht durch die Wirkung des atmosphärischen Sauerstoffes allein ausreichend in allen Fällen zu erklären. Man findet in Kulturen auch weit unter der Oberfläche braungefärbte Scheiden mit Fe_2O_3 und namentlich das Vorkommen von Eisenoxyden in den Zellen von Leptothrixfäden, die weit

[1] Siehe 2, p. 49.

vom Wasserspiegel ruhigstehender Kulturen entfernt sind, müßte diese Annahme gezwungen erscheinen lassen. An der Oxydation von FeO, beziehungsweise der Aufnahme oder Abspaltung von Fe in Oxydform aus irgend welchen Eisenverbindungen des umgebenden Mediums ist entschieden der Protoplast mit beteiligt.

Die hier mitgeteilten Beobachtungen und Erklärungen gelten in allem auch für die übrigen Eisenbakterien — ich hatte mit Ausnahme von Gallionella — alle anderen zur Verfügung; da diese Versuche aber an den übrigen fadenförmigen Eisenbakterien die gleichen Verhältnisse ergeben, so genügt es, der Kürze halber Leptothrix als Typus hinzustellen und an dieser Art sind auch die meisten Reaktionen durchgeführt worden.

J) Auf drei Punkte kann ich aber in dieser Arbeit noch nicht genauer eingehen: das Verhalten der Anthophysa, die Eisenablagerung in Membranen der Wasserpflanzen und Algen und die Untersuchungen an Spirophyllum. Das Verhalten der Anthophysa vegetans wird von Molisch[1] als wichtiger Gegengrund zu Winogradsky's Theorie hingestellt; doch gelten die von Molisch angeführten Punkte vielleicht nur für A. vegetans, denn eine bisher unbekannte Anthophysaart, die ich den Sommer dieses Jahres wiederholt beobachtete, zeigt ganz abweichende Bilder. Es ist eine schmale, stark eisenhaltige zentrale Röhre bis ganz knapp zur Kolonie der — auch im Bau abweichenden — Flagellaten vorhanden und dieser Stiel erst von einer kräftigen, auch mit Eisen inkrustierten Gallerte umgeben. Genauere Beobachtungen mit Rücksicht auf die hier behandelten Fragen wurden damals nicht angestellt und zur Zeit ist diese Anthophysaart nicht zu finden. Spirophyllum ferrugineum, das seit den Studien von Lieske[2] besonderes Interesse beansprucht,

---

[1] l. c. p. 57.

[2] Lieske Rud., Beiträge zur Kenntnis der Physiologie von Spirophyllum ferrugineum, einem typischen Eisenbakterium. Jahrb. f. wiss. Bot., 1911, 49. Bd., p. 91.

bedarf einer eingehenden morphologischen und physiologischen Bearbeitung, da die sonst ausgezeichneten Untersuchungen von Lieske in manchen Punkten ergänzt und nachgeprüft werden müssen, ehe dieser Eisenbakterie eine solche Sonderstellung zuerkannt werden sollte. Ich möchte nicht unterlassen, schon hier darauf hinzuweisen, daß nur aus Untersuchungen dieser in vielem recht ungenügend bekannten Bakterie keinerlei »Widerlegung« der so umsichtigen und exakten Versuche von Molisch gefolgert werden kann, was wohl von Lieske selbst betont, von anderen Autoren aber nicht genügend beachtet wird. Da mir derzeit ausgezeichnetes Material von Spirophyllum zur Verfügung steht, wird eine eingehende Untersuchung aller einschlägigen Fragen bei Spirophyllum durchgeführt. Ebenso gedenke ich die hier wesentlichen Ergebnisse auch an den von mir gefundenen neuen Eisenbakterien — 5 Arten — zu überprüfen, da diese Formen mancherlei Besonderheiten aufweisen.

K) Diese vergleichend durchgeführten Studien dürften wohl ohne weiteres die Möglichkeit erkennen lassen, die bisher ohne Vermittlung einander gegenüberstehenden Theorien von Winogradsky und Molisch zu vereinigen: es zeigt sich, daß gewisse Punkte in beiden Theorien, in sachgemäßer Weise vereinigt, einen Standpunkt ergeben können, von dem aus eine einheitliche Erklärung der meisten, vielleicht aller bisherigen, Beobachtungen und Versuche möglich ist.

Die Notwendigkeit und die Bedeutung der Eisenaufnahme und Oxydation als Energiequelle ist — vielleicht mit Ausnahme von Spirophyllum — durch Molisch's Versuche uneingeschränkt widerlegt, und damit der wesentlichste Gedanke der Theorie von Winogradsky hinfällig. Andererseits aber ist sicher eine Anzahl von Fällen aufgezeigt, wo Molisch's Annahme einer »Filterwirkung« der Scheide nicht ausreicht und einer Ergänzung bedarf. Gelegentlich äußert sich auch Molisch in diesem Sinne, wie aus den früher zitierten Stellen zu ersehen ist. In diesen Fällen aber geben die von Winogradsky geäußerten Gedanken einer Betei-

ligung des lebenden Protoplasten als des wichtigsten und ersten Ortes der Eisenaufnahme und -speicherung eine völlig ausreichende Grundlage. Der Vorgang der Eisenspeicherung ist sonach unter normalen Bedingungen, d. h. in sehr verdünnten Eisenlösungen natürlicher Wässer, als Eisenabscheidung von der Zelle her aufzufassen und nicht nur als Eiseneinlagerung der zur Zelle durch die Scheide vordringenden Lösung. In der durch äußere Mittel verschiedener Art (chemische Bedingungen wie Fe, Mn-Salzzusatz, mechanische Wirkung durch stete Berührung, Reaktion auf O-Zufuhr etc.) nachweisbaren Änderung der Ausbildung der Gallertscheiden durch das Plasma ist der erste Einfluß auf die Eisenspeicherung gegeben. Analog der Beizewirkung von Eisensalzen an Gallerten, wird auch in diesem Falle die Adsorptionsfähigkeit für Eisen eine Änderung erfahren, eine Verfestigung der Gallerte eintreten können. Die Annahme von Winogradsky, daß nur oder in erster Linie Oxydulverbindungen aufgenommen werden, ist durch die vorliegenden Untersuchungen ebensowenig zu bestätigen, als bei früheren Beobachtungen von Molisch. Es können je nach den äußeren Verhältnissen, sowohl Oxydule als Oxyde, sei es als anorganische oder organische Verbindungen aufgenommen werden; doch wird die Oxydation der Oxydulverbindungen, beziehungsweise die Abspaltung von Fe aus irgendwelchen Verbindungen unter Mitwirkung der Zelle erfolgen können und nicht in allen Fällen nur dem zutretenden, gelösten Sauerstoff zuzuschreiben sein. (Trachelomonas im Dunkel gehalten, bei hohem Eisenoxydgehalt im Protoplasten!)

Die hier hervorgehobenen Gesichtspunkte glaube ich durch die mitgeteilten eigenen Beobachtungen und den Hinweis auf bereits bekannte Ergebnisse der grundlegenden Versuche von Molisch ausreichend genug begründen zu können. Von diesem Standpunkte aus werden Versuche an Spirophyllum, anderen Eisenbakterien als Leptothrix, an Eisenalgen und eisenspeichernden Wasserpflanzen durchgeführt; es soll dabei sowohl die mikrochemische Analyse als das physiologische Experiment entsprechend berücksichtigt

werden. Diese Ergebnisse sollen Gegenstand einer zweiten Mitteilung sein.

Ich möchte nun schließlich auch hier Herrn Professor K. Linsbauer für das Interesse an dieser Arbeit ergebenst danken, ebenso für die gelegentlichen Anregungen bei Diskussionen des hier abgehandelten Themas.

Zusammenfassung.

1. Berlinerblaubildung als Reaktion auf Fe_2O_3-Verbindungen tritt bei Trachelomonasarten und Eisenbakterien in drei Typen auf: *a)* lokal auf eisenführende Teile des Organismus beschränkt, *b)* als körneliger oder homogen blauer Niederschlag auch außerhalb der Körperteile, *c)* in Form Traube'scher Zellen verschiedenster Gestalt und Größe an der Körper- beziehungsweise Schalen- und Scheidenoberfläche. Die Art und der Ort der endgültigen Fe-Probe hängt sowohl von der Art der Durchführung der Reaktion als auch von der Gegenwart des lebenden Protoplasten ab.

2. Außer im Gehäuse von Trachelomonas finden sich im Flagellaten Eisenverbindungen vor, die beim Absterben oder bei Reizung aus dem Protoplasma ausgestoßen werden.

3. Der lebende Flagellat, beziehungsweise die lebende Zelle von Eisenbakterien kann beträchtliche Mengen von Eisenoxydverbindungen führen, ohne daß das Gehäuse, beziehungsweise die Gallertscheide Eiseneinlagerung zeigt; Eisengehalt und Eisenspeicherung können daher getrennt von einander auftreten.

4. Das im Mikroskop zu beobachtende Ausstoßen eisenhaltiger Gallerte und Schleime, nachgewiesen durch Bildung ruckartig anwachsender Traube'scher Zellen beim Fe-Nachweis, ist als Reizvorgang aufzufassen, da nur lebende Trachelomonasarten dies zeigen; mechanische, chemische Reizung bewirkt diese aktive Ausscheidung besonders auffällig.

5. Im Gehäuse von Trachelomonas kommen sowohl FeO als auch Fe_2O_3-Verbindungen vor; im Flagellaten finden sich nur Fe_2O_3-Verbindungen.

6. Durch die mikrochemische Methode läßt sich leicht ein schaliger Bau aus differenten Schichten beim Trachelomonasgehäuse nachweisen, der aber weder durch direkte Beobachtung, noch durch Tinktionen zu differenzieren ist.

7. Bei Eisenbakterien, Leptothrix ochracea als Typus genommen, sind ähnliche Verhältnisse aufzuzeigen: auch der lebende Protoplast der Zelle führt große Mengen von Fe_2O_3-Verbindungen; Eisengehalt der Zelle und Eisenspeicherung sind in hohem Maße von einander unabhängig; jüngere Fäden mit kaum merklich ausgebildeter Scheide, die selbst eisenfrei ist, zeigen doch starke Eisenreaktion; die Intensität der Eisenreaktion ist in lebenden Zellen des ganzen Fadens annähernd gleich; in toten Zellen ist bei Leptothrix kein Fe_2O_3 mehr nachzuweisen.

8. Die nachgewiesenen Fe_2O_3-Verbindungen dürften nicht ausschließlich durch Oxydation der FeO-Verbindungen mit Hilfe des atmosphärischen Sauerstoffes entstanden sein. Die in der vorliegenden Untersuchung mitgeteilten Tatsachen weisen auf einen entscheidenden Einfluß des lebenden Protoplasten hin.

9. Die bisherigen Theorien der Eisenspeicherung von Winogradsky und Molisch lassen durch eine sinngemäße Vereinigung zu einem Standpunkt gelangen, der so ziemlich alle bisher bekannten einschlägigen Tatsachen erklären kann. Die durch Untersuchungen von Molisch nachgewiesene Entbehrlichkeit größerer Mengen von Fe-Salzen widerlegte die von Winogradsky angenommene Bedeutung der Fe-Verbindungen als Energielieferanten; die Fe-Speicherung, der hohe Fe-Gehalt der lebenden Zelle, die Veränderungen der Hüllen und Gallerten von Eisenorganismen auf Grund der Wirkung äußerer Reizungen weisen dagegen auf die von Winogradsky betonte Hauptrolle des lebenden Protoplasten hin.
